

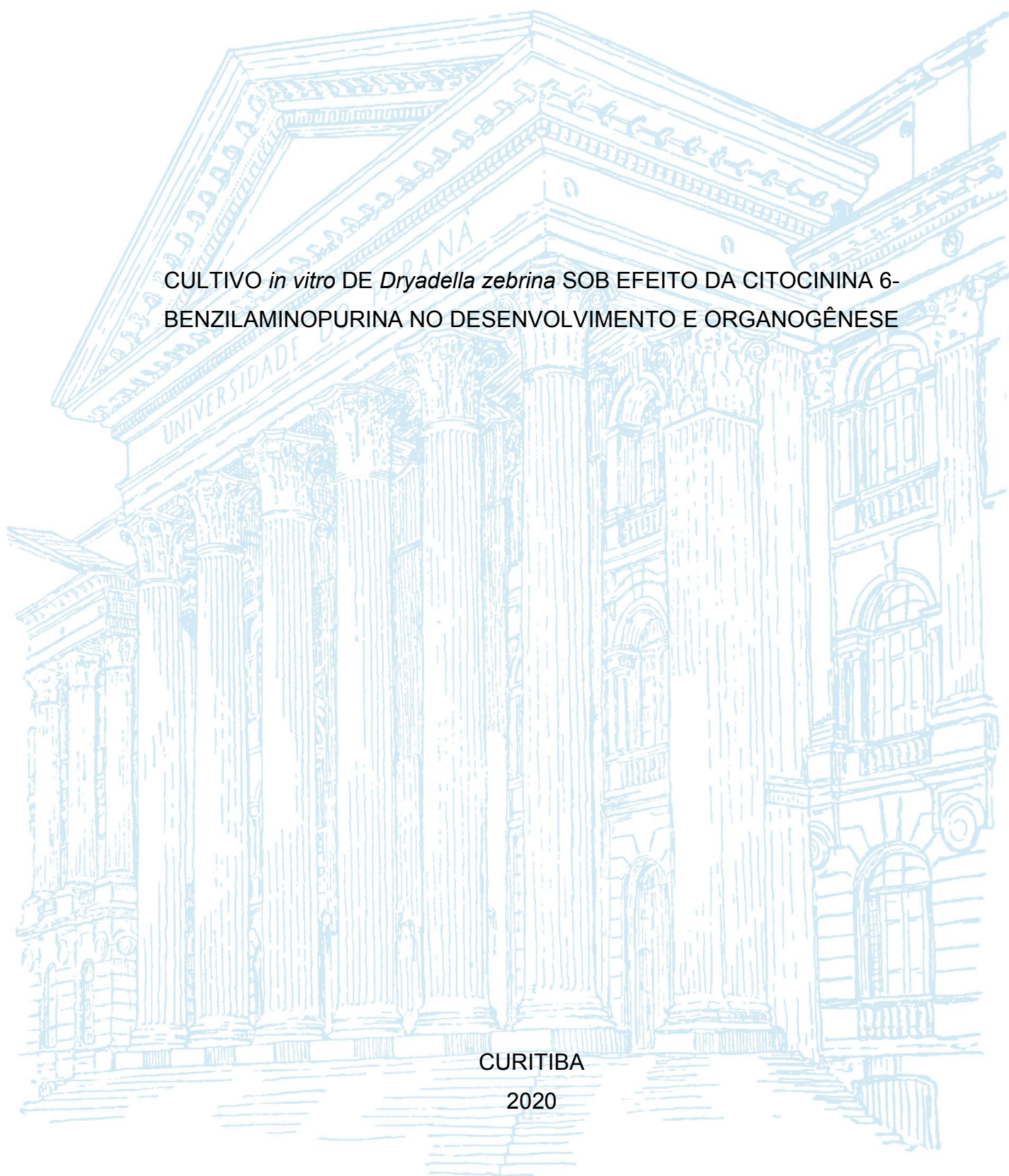
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JACKELINE DOS SANTOS ANJOS

CULTIVO *in vitro* DE *Dryadella zebrina* SOB EFEITO DA CITOCININA 6-BENZILAMINOPURINA NO DESENVOLVIMENTO E ORGANOGÊNESE

CURITIBA

2020



JACKELINE DOS SANTOS ANJOS

CULTIVO *in vitro* DE *Dryadella zebrina* SOB EFEITO DA CITOCININA 6-BENZILAMINOPURINA NO DESENVOLVIMENTO E ORGANOGÊNESE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Pacheco de Freitas Fraga.

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Anjos, Jackeline dos Santos
Cultivo *in vitro* de *Dryadella zebrina* sob efeito da citocinina 6-
benzilaminopurina no desenvolvimento e organogênese. / Jackeline dos
Santos Anjos. – Curitiba, 2020.
51 p.: il.

Orientador: Hugo Pacheco de Freitas Fraga.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Orquídea. 2. Plantas – Propagação in vitro. 3. Germinação. 4.
Biotecnologia. I. Título. II. Fraga, Hugo Pacheco de Freitas, 1987-. III.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Botânica.

CDD (22. ed.) 584.4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BOTÂNICA -
40001016004P9

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BOTÂNICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JACKELINE DOS SANTOS ANJOS** intitulada: **CULTIVO in vitro DE *Dryadella zebrina* SOB EFEITO DA CITOCININA 6BENZILAMINOPURINA NO DESENVOLVIMENTO E ORGANOGÊNESE**

, sob orientação do Prof. Dr. HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 18 de Dezembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

18/01/2021 18:50:44.0

HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

19/01/2021 13:56:36.0

LEILA DO NASCIMENTO VIEIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

19/01/2021 14:30:05.0

YOHAN FRITSCHÉ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

CENTRO POLITECNICO - Curitiba - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1625 - E-mail: pgbotanica.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 66660

ra autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 66660

Dedicado à minha família, principalmente a minha Mãe, que sempre me apoiou e incentivou, dizendo que os estudos sempre são o melhor caminho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me conceder saúde e energia para a realização do presente trabalho.

À minha família, em especial à minha mãe, Maria Cleonice dos Santos Anjos e madrinha Lourdete dos Santos, que me deram suporte e conselhos durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos, por toda ajuda e compreensão da minha ausência em muitos dos encontros. Às minhas melhores amigas e irmãs, Juliane Cristine Santos dos Anjos, Isabella Santos dos Anjos e Gabriella Luquesi, pela parceria, força e ajuda em muitos momentos durante a elaboração do trabalho.

As minhas amigas, Mayra Cristina de Carvalho, Camila Ribeiro de Carvalo, Raquel dos Santos, Bruna Evelyn, obrigada pela compreensão e apoio durante esses anos.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Hugo Pacheco de Freitas Fraga, pela inspiração e orientação durante os dois anos, pelos conselhos, elogios e quando necessárias, broncas, que foram fundamentais para elaboração desse trabalho.

A todos os meus colegas do Laboratório de Micropropagação Vegetal, pelas conversas e auxílios durante o desenvolvimento do trabalho. Principalmente a Fabrícia Lorrane R. Oliveira, pelas risadas e ajuda, Maria Clara Akiri e Clarissa Alves Stefanello por suas contribuições com o trabalho.

Aos Prof. Eric Smidt e a Msc. Daniela Imig por gentilmente ceder as sementes de *Dryadella zebrina* utilizadas no presente trabalho.

À Universidade Federal do Paraná, por me proporcionar não só a estrutura, mas também as experiências e momentos que levaram à elaboração desse trabalho. Como também todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Para o trabalho que gostamos, levantamo-nos cedo e fazemo-los com
alegria.

William Shakespeare

RESUMO

As orquídeas tendem a produzir uma grande quantidade de sementes, mas apresentam baixas taxas de germinação na natureza devido à ausência de tecido de reserva e a necessidade de interação com fungos micorrízicos para estabelecer uma germinação efetiva. O cultivo *in vitro* de plantas é uma biotecnologia que permite a propagação e conservação *ex situ* de espécies vegetais, e tem sido extensivamente empregado para diversas espécies de orquídeas. No entanto, existem poucos relatos do seu uso para orquídeas da Subtribo Pleurothallidinae. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer caracterização na fase inicial de desenvolvimento *in vitro* e avaliar os efeitos de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina durante a organogênese de *Dryadella zebrina*. Sementes de *D. zebrina* foram germinadas *in vitro* e as plântulas obtidas através do experimento de alongamento com 1 µM ácido 1-naftalenoacético, foram submetidas a diferentes concentrações de BAP em meio de cultura WPM. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e sete repetições, sendo avaliados após 60 dias os parâmetros: porcentagem de oxidação e sobrevivência, comprimento dos brotos, porcentagem de enraizamento, número médio e comprimento das raízes e número médio de novos brotos, as análises anatômicas foram realizadas para complementar a fase de avaliação. A germinação das sementes de *Dryadella zebrina* em meio WPM ocorreu eficientemente, gerando protocormos bem formados. O uso de auxina ANA mostrou resultados positivos na fase de alongamento e enraizamento *in vitro*, permitindo a formação de plântulas saudáveis. O BAP aumentou a formação de novos brotos de *Dryadella zebrina*, sendo indicado seu uso para fase de multiplicação *in vitro*. As análises anatômicas das raízes e folhas permitiram visualizar o comportamento e arranjos de células de acordo com a concentração de BAP em que as plântulas estavam submetidas. Nas raízes, foi observada uma menor organização da região meristemática e a confirmação de acúmulo de compostos fenólicos, especialmente na região do câmbio vascular. Neste sentido, foi possível estabelecer uma concentração ideal para favorecer a formação de novos brotos de *Dryadella zebrina*, representando o primeiro relato bem-sucedido de propagação *in vitro* de uma espécie do gênero *Dryadella*. Os dados aqui obtidos poderão servir como base para novos estudos de propagação *in vitro* de espécies filogeneticamente próximas.

Palavras-chave: Micropropagação. Orquídeas. Orchidaceae. Pleurothallidinae. Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Orchids tend to produce a large amount of seeds, but they have low germination rates in nature due to the absence of reserve tissue and the need to interact with mycorrhizal fungi to establish an effective germination. *In vitro* plant cultivation is a biotechnology that allows the *ex situ* propagation and conservation of plant species, and has been used extensively for several species of orchids. However, there are few reports of its use for orchids of the Subtribo Pleurothallidinae. In this context, the objective of the present work was to establish characterization in the initial stage of development *in vitro* and to evaluate the effects of different concentrations of 6-benzylaminopurine during the organogenesis of *Dryadella zebrina*. *D. zebrina* seeds were germinated *in vitro* and the seedlings obtained through the elongation experiment with 1 μ M 1-naphthalenoacetic acid, were submitted to different concentrations of BAP in WPM culture medium. The experimental design was completely randomized, with six treatments and seven replicates, after which the parameters were evaluated after 60 days: percentage of oxidation and survival, length of shoots, percentage of rooting, average number and length of roots and average number of new shoots, the anatomical analyzes were performed to complement the assessment phase. The germination of *Dryadella zebrina* seeds in WPM medium occurred efficiently, generating well-formed protocols. The use of ANA showed positive results in the elongation and rooting phase *in vitro*, allowing the formation of healthy seedlings. BAP increased the formation of new *Dryadella zebrina* shoots, and its use is indicated for the *in vitro* multiplication phase. The anatomical analyzes of the roots and leaves allowed to visualize the behavior and arrangements of cells according to the concentration of BAP in which the seedlings were submitted. In the roots, it was observed a less organization of the meristematic region and confirmation of accumulation of phenolic compounds, especially in the region of the vascular exchange. In this sense, it was possible to establish an ideal concentration to favor the formation of new *Dryadella zebrina* shoots, representing the first successfully report for *in vitro* propagation for the genus *Dryadella*. The data obtained here may serve as a basis for further studies of *in vitro* propagation of phylogenetically close species.

Keywords: Micropropagation. Orchids. Orchidaceae. Pleurothallidinae. *In vitro* culture

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – IMAGEM DA ESPÉCIE-ALVO DO PRESENTE TRABALHO, <i>Dryadella zebrina</i> .	21
FIGURA 2 – CÁPSULA MADURA DE <i>Dryadella zebrina</i> .	26
FIGURA 3 – FLUXOGRAMA REPRESENTATIVO DA METODOLOGIA DO PRESENTE TRABALHO, DESDE ESCOLHA DO MATERIAL VEGETAL ATÉ AS ANÁLISES AVALIATIVAS.	29
FIGURA 4 – ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE <i>Dryadella zebrina</i> INOCULADAS <i>in vitro</i> .	30
FIGURA 5 – PLÂNTULA DE <i>Dryadella zebrina</i> APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO WPM SUPLEMENTADO COM 1 μ M DE ÁCIDO 1-NAFTALENOACÉTICO COM PRESENÇA DE FOLHAS E RAÍZES.	32
FIGURA 6 – PORCENTAGENS DE SOBREVIVÊNCIA (A) E OXIDAÇÃO (B) DE PLANTAS DE <i>D. zebrina</i> APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA	34
FIGURA 7 – NÚMERO MÉDIO DE BROTO FORMADOS APÓS 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA.	36
FIGURA 8– NÚMERO MÉDIO DE FOLHAS (A) E COMPRIMENTO MÉDIO FOLIAR (B) DE PLANTAS DE <i>D. zebrina</i> APÓS 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA	37
FIGURA 9 – NÚMERO MÉDIO (A) E COMPRIMENTO MÉDIO (B) DE RAÍZES DE PLANTAS DE <i>D. zebrina</i> APÓS 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA.	38
FIGURA 10 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS PLÂNTULAS APÓS 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP.	40
FIGURA 11 – ANATOMIA DE RAIZ DE <i>DRYADELLA ZEBRINA</i> COM CORTES LONGITUDINAIS EM MICROSCOPIA DE LUZ APÓS 120 DIAS.	42

FIGURA 12 – ANATOMIA FOLIAR DE *DRYADELLA ZEBRINA* COM CORTES LONGITUDINAIS EM MICROSCOPIA DE LUZ, APÓS 120 DIAS.....44

LISTA SIGLAS

ANA	- Ácido 1-naftalenoacético.
BAP	- 6-Benzilaminopurina.
DZF6	- Identificação da Cápsula de <i>Dryadella zebrina</i> .
WPM	- Meio de cultura LLOYD e MCCOWN, 1980.
FI	- Floema
Fv	- Feixe Vascular
P	- Parênquima
Pc	- Procambio
Nu	- Célula contendo núcleo em evidência
RAM	- Meristema apical da raiz
Va	- Célula contendo Vacúolo
Xi	- Xilema

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE	19
3.2 SUBTRIBO PLEUROTHALLIDINAE	20
3.3 <i>DRYADELLA ZEBRINA</i>	21
3.4 TÉCNICAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	22
3.5 MEIO DE CULTURA	22
3.6 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAIS.....	23
4 CAPÍTULO I: EFEITOS DA CITOCININA 6-BENZILAMINOPURINA NO DESENVOLVIMENTO E ORGANOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DE <i>DRYADELLA ZEBRINA</i>	24
4.1 INTRODUÇÃO	244
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	255
4.2.1 MATERIAL VEGETAL	255
4.2.2 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	26
4.2.3 ALONGAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS.....	27
4.2.4 ETAPA DE MULTIPLICAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP	27
4.2.5 ANÁLISES MORFOANATÔMICAS	28
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.3.1 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES E DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i>	29
4.3.2 ETAPA DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS	32
4.3.3 EFEITOS DO BAP NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	33
4.3.4 ANÁLISES MORFOANATÔMICAS	40
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	444
6 REFERÊNCIAS.....	466

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As orquídeas apresentam alta importância econômica, ecológica e medicinal (DRESSLER, 2005; LO et al., 2004). No Brasil, as orquídeas possuem destaque nas áreas de jardinagem e paisagismo (JUNQUEIRA e PEETZ, 2017). As orquídeas têm uma imensa diversidade floral e de hábitos de crescimento (epífitas, rupícolas, terrícolas, e etc) (MILLER; WARREN, 1996; CHASE *et al.*, 2015), uma alta diversidade morfológica das partes vegetativas, além das reprodutivas (PINHEIRO *et al.*, 2004), sendo essa diversidade relacionada com o sucesso adaptativo em ambientes bastante distintos (HOEHNE, 1940).

Apesar dessa alta diversidade e adaptabilidade, as orquídeas são altamente susceptíveis a perdas em biodiversidade, devido aos desmatamentos, que causam declínio de polinizadores, como também pelo comércio não autorizado, que leva a uma redução da população em ambientes naturais. Essas ações antrópicas as tornam potencialmente ameaçadas ou até mesmo extintas na natureza, devido à perda de habitats (PRIDGEON e CHASE, 2003).

A espécie-alvo deste trabalho, *Dryadella zebrina*, pertence à subtribo Pleurothallidinae, que é uma subtribo Neotropical da família Orchidaceae, possui cerca de 5.100 espécies distribuídas em 44 gêneros (KARREMANS, 2016). Seus membros são caracterizados por apresentarem crescimento simpodial, ausência de pseudobulbos, presença de ânulos dos caules aéreos unifoliados que surgem através de rizomas e uma articulação entre o pedicelo e o ovário (PRIDGEON e CHASE, 2003).

A propagação natural das orquídeas é feita majoritariamente por meio de sementes, as quais são extremamente diminutas e tendem a encontrar dificuldades para germinar em sua área de ocorrência natural, além de serem dependentes da simbiose com fungos micorrízicos (JOHANSEN e RASMUSSEN, 1992), que auxiliam na absorção de água e sais minerais presentes no solo. Além disso, as sementes de orquídeas, em geral, não possuem tecidos de reserva e apresentam crescimento lento (DRESSLER, 1981).

Levando em consideração a dificuldade de obtenção de sementes e a complexidade das condições ideais para desenvolvimento em ambiente natural, as técnicas biotecnológicas, como o cultivo *in vitro* de plantas, possibilitam a

propagação dessas espécies de forma eficiente e em larga escala, e também a manutenção e preservação do material genético.

Neste sentido, um passo essencial para a aplicação da micropropagação é conhecer as condições indicadas para a germinação e desenvolvimento *in vitro*, como a formulação salina, tipos e concentrações de reguladores, entre outros fatores. Os resultados obtidos no presente trabalho representam o primeiro relato de cultivo *in vitro* para espécie *Dryadella zebrina* e o primeiro protocolo bem-sucedido para o gênero *Dryadella*, e podem contribuir de forma expressiva no cultivo e propagação de outras espécies da subtribo Pleurothallidinae.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visou estabelecer a caracterização na fase inicial de desenvolvimento *in vitro* e avaliar os efeitos de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina durante a organogênese de *Dryadella zebrina*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a germinação e desenvolvimento *in vitro* da espécie-alvo visando a obtenção de plântulas em meio de cultura WPM;
- b) Realizar a fase de alongamento e formação de raízes através da suplementação do regulador de crescimento ácido 1-naftalenoacético (ANA) ao meio de cultura;
- c) Realizar o desenvolvimento *in vitro* da espécie-alvo através da técnica da Organogêneses, com diferentes concentrações do regulador de crescimento vegetal 6-Benzilaminopurina (BAP);
- d) Avaliar macroscopicamente a formação de novos brotos na fase de multiplicação, levando em consideração os padrões avaliativos.
- e) Avaliar morfoanatômicamente o desenvolvimento das plantas da espécie-alvo quando expostas a diferentes concentrações de BAP.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE

A família Orchidaceae é considerada uma das maiores famílias botânicas de plantas com flores, possuindo cerca de 25.000 espécies e sendo constituída por aproximadamente 800 gêneros (FAY; CHASE, 2009). São um grupo com distribuição cosmopolita, sendo a maioria dos representantes concentrados principalmente nos Neotrópicos (DRESSLER, 1983, HOEHNE, 1940).

O grupo possui um grau de variedade morfológico das partes reprodutivas e vegetativas (presença de caules, folhas ou pseudobulbos espessados, raízes) (PINHEIRO *et al.*, 2004), quais estão relacionados com o sucesso adaptativo em ambientes bastante distintos como, terrícolas, epífitas, rupícolas e micoheterotróficas (HOEHNE, 1940).

O Brasil possui uma das maiores diversidades de orquídeas, podendo ser epífitas e endêmicas, observadas em árvores, pedras ou na área terrestre (MILLER; WARREN, 1996; CHASE *et al.*, 2015). Anteriormente, eram descritas cerca de 2.300 espécies de orquídeas no Brasil (PABST, 1975, DUNGS, 1977), sendo esse número elevado para 2.600 espécies, segundo Barros (2016). Dentre essas espécies, uma grande quantidade pode ser encontrada na Amazônia brasileira, onde foram registradas cerca de 380 espécies por Silva *et al.* (1995).

No Brasil o comércio de plantas ornamentais tem crescido nos últimos anos nas áreas de jardinagem e paisagismo, rendendo um valor global de 6,5 bilhões em 2016 (JUNQUEIRA e PEETZ, 2017). As principais plantas comercializadas são as orquídeas, bromélias, violetas, lírios, *Kalanchoe* e crisântemo, sendo que as orquídeas representam cerca de 14% desse grupo (JUNQUEIRA e PEETZ, 2017).

As orquídeas são altamente susceptíveis a perdas em biodiversidade, devido aos desmatamentos para urbanização, causando o declínio de polinizadores, ao comércio não autorizado que leva a uma redução da população em ambientes naturais (HOSSAIN *et al.*, 2009; SWARTS e DIXON, 2009). Além disso, as inflorescências exuberantes e seu uso para a ornamentação levam a coleta predatória para fins econômicos, uma séria ameaça para muitas espécies, as tornando potencialmente criticamente ameaçadas ou extintas devido à perda de habitats (PRIDGEON e CHASE, 2003).

Consequentemente, a família Orchidaceae como um todo foi incluída na CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas) Apêndice II (SHEFFERSON *et al.*, 2005), onde incluem espécies que deve ter o seu comércio controlado e métodos para sua propagação e conservação estimulados.

3.2 SUBTRIBO PLEUROTHALLIDINAE

A subtribo Pleurothallidinae é uma subtribo Neotropical da família Orchidaceae, possui cerca de 5.100 espécies distribuídas em 44 gêneros (KARREMANS, 2016), o que representa aproximadamente 16% da família. Seus membros são caracterizados por apresentarem crescimento simpodial, ausência de pseudobulbos, presença de ânulos dos caules aéreos unifoliados que surgem através de rizomas e uma articulação entre o pedicelo e o ovário (PRIDGEON e CHASE, 2003).

As Pleurothallidinae, por não apresentarem pseudobulbos, tem a presença de um parênquima aquífero bem desenvolvido no mesofilo, com espessamentos espiralados nas paredes das células, o que ajuda durante o período de seca (PRIDGEON, 1982; SCATENA & NUNES, 1996; SILVA *et al.*, 2006; AVI, 2012; WARMLING, 2013). Nas raízes tem a presença de uma epiderme multisseriada (velame), o que permite uma mobilização temporária, dando mais acesso à água e sais minerais, também protegendo os tecidos subjacentes contra danos mecânicos e evitando a dessecação (ENGARD, 1944; ESAU, 1966; CUTTER, 1969, 1971; FAHN, 1974; PRIDGEON, 1983; RUDALL, 1987; BENZING, 1990).

Inicialmente os seus gêneros foram agrupados com base do número de polínias: oito, seis, quatro ou duas (LUER, 1986). Mas através de dados da biologia molecular, foi verificado que a subtribo Pleurothallidinae forma um grupo monofilético, posicionado dentro da tribo Epidendreae (CHASE *et al.*, 2015; GIVNISH *et al.*, 2015; VAN DEN BERG *et al.*, 2005).

A propagação natural das orquídeas é feita por meio de sementes, as quais contém um embrião pequeno, com cerca de 0,1 mm de diâmetro, e não apresenta tecido de reserva associado. As sementes de orquídeas tendem a ter dificuldade para germinar em sua área de ocorrência natural, e a relação simbiótica entre orquídeas e fungos (fungos micorrizicos), desempenha um papel essencial na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas, (JOHANSEN e RASMUSSEN, 1992), pois auxiliam na absorção de água e sais minerais presente

no solo. Além disso, as sementes de orquídeas, em geral, apresentam crescimento lento (DRESSLER, 1981).

Levando em consideração a dificuldade de obtenção de sementes e suas condições para se desenvolver, as técnicas biotecnológicas, como o cultivo *in vitro* de plantas, possibilita a propagação dessas espécies em larga escala e também a manutenção e preservação do material genético em bancos de germoplasma.

3.3 DRYADELLA ZEBRINA

A *Dryadella zebrina* é uma espécie que faz parte da Subtribo Pleurothallidinae, tendo sido descrita em 1905 por Otto Porsch. Essa espécie apresenta crescimento simpodial e habita de forma epífita florestas úmidas e sombreadas. São plantas compactas, de rizomas curto, com raízes revestidas por velame, de folhas pequenas de até 4 cm de comprimento que emergem do rizoma (Figura 1).



Figura 1. Imagem da espécie-alvo do presente trabalho, *Dryadella zebrina*. Fonte: Eric Smidt, Daniela Imig e Rothamns Giubert Klippel de Ataíde.

Sua inflorescência é curta e uniflora, possuindo flores consideradas grandes para as espécies desse gênero, dentre 1,0 e 1,5 cm de diâmetro (LUER 1999). Suas flores se destacam por apresentarem características que lembram as marcas na pele das zebras, isso por si só destaca bem o seu nome, ou seja, a mesma

apresenta sépalas e pétalas amarelas e pintas de coloração marrom avermelhado (LUER, 2006).

3.4 TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO*

A produção de orquídeas a partir de técnicas de cultivo *in vitro* é uma alternativa viável para a obtenção de um grande número de plantas em um curto período de tempo, permitindo esta aquisição de mudas com qualidade comprovada para os produtores de orquídeas (ARAÚJO *et al.*, 2009). Vale ressaltar que, as plantas produzidas dessa forma, também podem ser utilizadas em programas de conservação de espécies nativas em áreas de preservação ambiental, devido a manutenção da variabilidade genética dos explantes.

O método de germinação assimbiótica, ou germinação *in vitro* de orquídeas, foi estabelecido por Lewis Knudson em 1922, onde as sementes de orquídeas poderiam germinar sem a necessidade de associação com fungos micorrizicos, quando o meio de cultivo fosse enriquecido com alguma fonte de carbono. As técnicas de cultivo *in vitro* tem uma alta capacidade de propagação e obtenção de plântulas de qualidade elevada, num ambiente estéril, sendo empregadas para obtenção de plantas em larga escala (KLEIN, 2008).

Sua semeadura *in vitro*, pode ocorrer em dois estádios de maturação: no primeiro espera-se a cápsula secar naturalmente e se abrir; no segundo coleta-se a cápsula ainda levemente imatura, antes da deiscência natural para germinação, e realiza-se a assepsia de toda a cápsula para posteriormente, em ambiente asséptico, realizar-se a inoculação das sementes (STANCATO *et al.*, 2001).

Acompanhar o processo de germinação e desenvolvimento *in vitro* das plantas através de análises morfoanatômicas pode contribuir de forma expressiva na compreensão dos diferentes eventos que ocorrem durante essas diferentes etapas, como o processo germinativo, de alongamento e multiplicação *in vitro* das plantas.

3.5 MEIO DE CULTURA

A formulação do meio de cultura é essencial para o desenvolvimento do explante, pois fornece os constituintes necessários (minerais, vitaminas, reguladores de crescimentos), podendo ser desenvolvido com diferentes formulações, sendo o

sucesso da técnica de cultivo *in vitro* dependente da melhor compreensão dos requerimentos nutricionais das células e dos tecidos em cultura.

Os meios de cultura mais comumente utilizados para a germinação de orquídeas são o Murashige e Skoog (MS; MURASHIGE e SKOOG, 1962), Knudson C (KC; KNUDSON, 1946), Vacin e Went (VW; VACIN e WENT, 1949) e WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980).

Esses meios nutritivos, além de apresentarem os componentes essenciais, tendem a serem suplementados com vitaminas, carboidratos, reguladores de crescimento vegetais, carvão ativado, agente geleificantes, dentre outros compostos para atender as necessidades metabólicas e fisiológicas de cada espécie (GEORGE *et al.*, 2008).

3.6 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAIS

Na micropropagação, reguladores de crescimento vegetais normalmente são utilizados para auxiliar num melhor desenvolvimento da plântula (BARROSO *et al.*, 1990; MIYOSHI e MII, 1995). Da mesma forma, a luz e temperatura, quando estão em igualmente equilibrados (meio de cultura, regulador, luz, pH e temperatura), podem acelerar o processo de desenvolvimento (HADLEY e HARVAIS, 1968). Alguns dos reguladores mais utilizados tem sido o ANA (ácido 1-naftalenoacético) e o BAP (6-benzilaminopurina), pois promovem um aumento na pré-germinação e formação de protocormos nas orquídeas (MIYOSHI e MII, 1995).

A suplementação de auxinas e citocininas ao meio de cultura é, frequentemente, necessária para regular o crescimento e a morfogênese nos tecidos vegetais *in vitro* (VICTÓRIO *et al.*, 2008). Com o intuito de estimular os processos de divisão e diferenciação celular, a suplementação de citocininas é altamente indicada. O uso de 6-benzilaminopurina (BAP), além de ser uma das mais utilizadas (LINO *et al.*, 2009), pode auxiliar na multiplicação de explantes e indução de gemas, como também é um dos reguladores vegetais de menor custo (CAMPOS *et al.*, 2007).

4 CAPITULO I: EFEITOS DA CITOCININA 6-BENZILAMINOPURINA NO DESENVOLVIMENTO E ORGANOGENESE *in vitro* DE *Dryadella zebrina*

4.1 INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de plantas com flores (THE PLANT LIST 2013), e suas espécies têm grande importância econômica, ecológica e medicinal (DRESSLER 2005; LO et al. 2004). Pleurothallidinae é uma subtribo neotropical da família Orchidaceae, que possui cerca de 5.100 espécies, distribuídas em 44 gêneros (KARREMANS & DAVIN 2017).

Dryadella zebrina (Porsch) Luer é uma das espécies pertencentes à Subtribo Pleurothallidinae e se caracteriza por apresentar plantas compactas, com rizoma curto, raízes revestidas por velame com inflorescência curta e uniflora (LUER 1999). Suas flores se destacam por apresentarem sépalas e pétalas amarelas com manchas marrom-avermelhadas (LUER 2006).

As orquídeas, incluindo *D. zebrina*, produzem um grande número de sementes. No entanto, a taxa de germinação na natureza é considerada baixa, devido à ausência de tecido de reserva e à necessidade de interação com fungos micorrízicos (ARDITTI & GHANI 2000). Além disso, as orquídeas são altamente suscetíveis a perdas de biodiversidade, que podem ser causadas por desmatamento, declínio de polinizadores e coleta predatória, levando à redução da população em ambientes naturais (HOSSAIN et al. 2009; SWARTS & DIXON 2009).

As técnicas de micropropagação são amplamente utilizadas para diversas espécies de orquídeas e consistem no cultivo de tecidos vegetais em ambiente asséptico sob condições fisiológicas adequadas e controladas. Esta técnica permite obter um grande número de plantas em um pequeno espaço e em um curto espaço de tempo, bem como manter a identidade genética dos indivíduos (LI et al. 2018).

Na micropropagação, a suplementação de reguladores de crescimento de plantas ao meio de cultura é usada para melhorar o desenvolvimento de plântulas de orquídeas (MIYOSHI & MII 1995; BHATTACHARYYA et al. 2016). Essa suplementação é uma das principais estratégias para controlar e regular o desenvolvimento *in vitro*, principalmente com o uso de citocininas e auxinas (AREMU et al. 2016).

O uso da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na micropropagação de orquídeas é eficiente na indução da formação de múltiplas gemas e na regulação da organogênese *in vitro* (ADHIKARI et al. 2019; CASTILLO-PÉREZ et al. 2020). Concentrações específicas de BAP estimularam a indução de estruturas semelhantes a protocormos em *Hadrolaelia grandis* (Vudala et al. 2019), uma espécie de orquídea também pertencente à subtribo Pleurothallidinae. No entanto, não há relatos sobre os efeitos do BAP em espécies do gênero *Dryadella* cultivadas *in vitro*.

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo investigar o desenvolvimento *in vitro* de *D. zebrina* e avaliar os efeitos de diferentes concentrações de BAP durante a organogênese por meio de análises morfoanatômicas. Os resultados aqui obtidos representam o primeiro relato de cultivo *in vitro* bem-sucedido para espécies do gênero *Dryadella* e podem contribuir para o aumento do conhecimento sobre a micropropagação de espécies de Pleurothallidinae.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi constituído por sementes de *Dryadella zebrina* obtidas a partir da coleta de cápsulas maduras (Figura 2) de plantas adultas submetidas à polinização cruzada manual, com cruzamento controlado. Essas plantas foram coletadas no Rio do Corvo, Piraquara, Paraná (25 ° 19'42,9" S 48 ° 54'50,2" W - 48,9139 -25,3286), e mantidas em casa de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, Brasil). Os espécimes também foram depositados no Herbário UPCB (UFPR) sob o número DC Imig 405.



Figura 2. Cápsula madura de *Dryadella zebrina*.

4.2.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

Para a germinação *in vitro*, foi utilizado meio de cultura composto por sais e vitaminas WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), o qual foi suplementado com 2% de sacarose (p/v), 0,1% de glutamina e gelificado com 3 g L⁻¹ de Phytigel™. O volume e o pH (5,8) do meio de cultura foram ajustados antes da adição do agente geleificante. O meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 20 min.

As cápsulas de *D. zebrina* foram lavadas em água corrente e submetidas à assepsia com etanol 70% por 10 min, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v) com Tween-20™ 0,1 % por 30 min. Em seguida, as cápsulas foram lavadas seis vezes com água destilada estéril.

Após esse procedimento, as sementes foram retiradas das cápsulas e suspensas em 750 µL de água estéril. Foram pipetados 250 µl da suspensão em três placa de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL do meio de cultura descrito acima. As culturas foram mantidas a 26 ± 2 ° C / 18 ± 2 ° C (claro / escuro), sob fotoperíodo de 16 h de luz sob lâmpadas LED brancas (40 µmol m⁻² s⁻¹).

O material vegetal foi analisado morfológicamente para monitorar o processo de germinação. A germinação foi avaliada após 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo com

auxílio de estereomicroscópio (SMZ-171, Motic). Consideramos germinados os protocormos verdes com ápice caulinar bem desenvolvido.

4.2.3 ALONGAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS

A utilização do meio de cultura suplementado com 1 μM ácido 1-naftalenacético (ANA), foi empregado na fase de alongamento e desenvolvimento, após ensaios anteriores indicarem um melhor desenvolvimento da espécie *D. zebrina* (dados não apresentados).

Os protocormos obtidos na etapa anterior foram transferidos, após 120 dias de cultivo, para o meio de cultura com os mesmos componentes descritos acima suplementado com 1 μM de ácido 1-naftalenacético (ANA). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição de 3 g L⁻¹ de Phytigel™. O meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 20 minutos.

As plântulas (n = 30) foram distribuídas homogeneamente nas placas de Petri e foram mantidas 60 dias em sala de crescimento, com temperatura de 26 \pm 2 ° C / 18 \pm 2 ° C (claro / escuro), sob fotoperíodo de 16 h. de luz sob lâmpadas LED brancas (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

4.2.4 ETAPA DE MULTIPLICAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP

As plântulas obtidas na etapa de alongamento foram utilizadas para este experimento. O meio de cultura foi o mesmo descrito acima, suplementado com 1 μM de ANA e seis diferentes concentrações de BAP (0, 3, 6, 9, 12 e 15 μM). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição de 3 g L⁻¹ de Phytigel™. O meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Os explantes foram inoculados em frascos de vidro (8,5 cm de altura x 5,8 cm de diâmetro) contendo 30 mL de meio de cultura. Foram inoculadas sete plantas por frasco, com sete frascos por tratamento, totalizando 42 frascos. As culturas foram transferidas para uma sala de crescimento a uma temperatura de 26 \pm 2 ° C / 18 \pm 2 ° C (claro / escuro), sob fotoperíodo de 16 h de luz sob lâmpadas LED brancas (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Após 30 dias da inoculação, as seguintes variáveis foram avaliadas: (1) Porcentagem de oxidação e sobrevivência; (2) Comprimento dos brotos; (3) Porcentagem de enraizamento; (4) Número médio e comprimento das raízes; (5) Número médio de novos brotos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de separação de médias SNK ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o pacote R-Bio (BHERING 2017) em ambiente R.

4.2.5 ANÁLISES MORFOANATÔMICAS

Para as análises morfoanatômicas foram coletadas amostras da região mediana das folhas e ápices radiculares de plântulas derivadas dos tratamentos mais contrastantes. A fixação do material foi realizada em solução de tampão fosfato 0,1 M e paraformaldeído 2,5% a 4 ° C por 24 h. Em seguida, o material foi lavado duas vezes por 15 min com tampão fosfato 0,1 M e desidratado em série etílica (30, 50, 70 e 90%), seguido de duas lavagens de 30 min em etanol absoluto.

O material foi infiltrado seguindo a proporção (2: 1; 1: 1; 1: 2) de etanol absoluto e resina de metacrilato (Historesina, Leica®), e imersão de 24 h em Historesina pura. As amostras foram incluídas em Historesina e endurecedor na proporção de 15: 1, de acordo com as recomendações do fabricante. Após 24h, os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo (5 µm de espessura, SLEE Technik®). Os cortes obtidos foram tratados com solução aquosa de azul de toluidina (1%) e Bórax (1%), pH 9 (KUO & O'BRIEN 1974), os aspectos histológicos mais relevantes foram observados e registrados em microscópio invertido (Olympus IX81) acoplado a uma câmera digital.

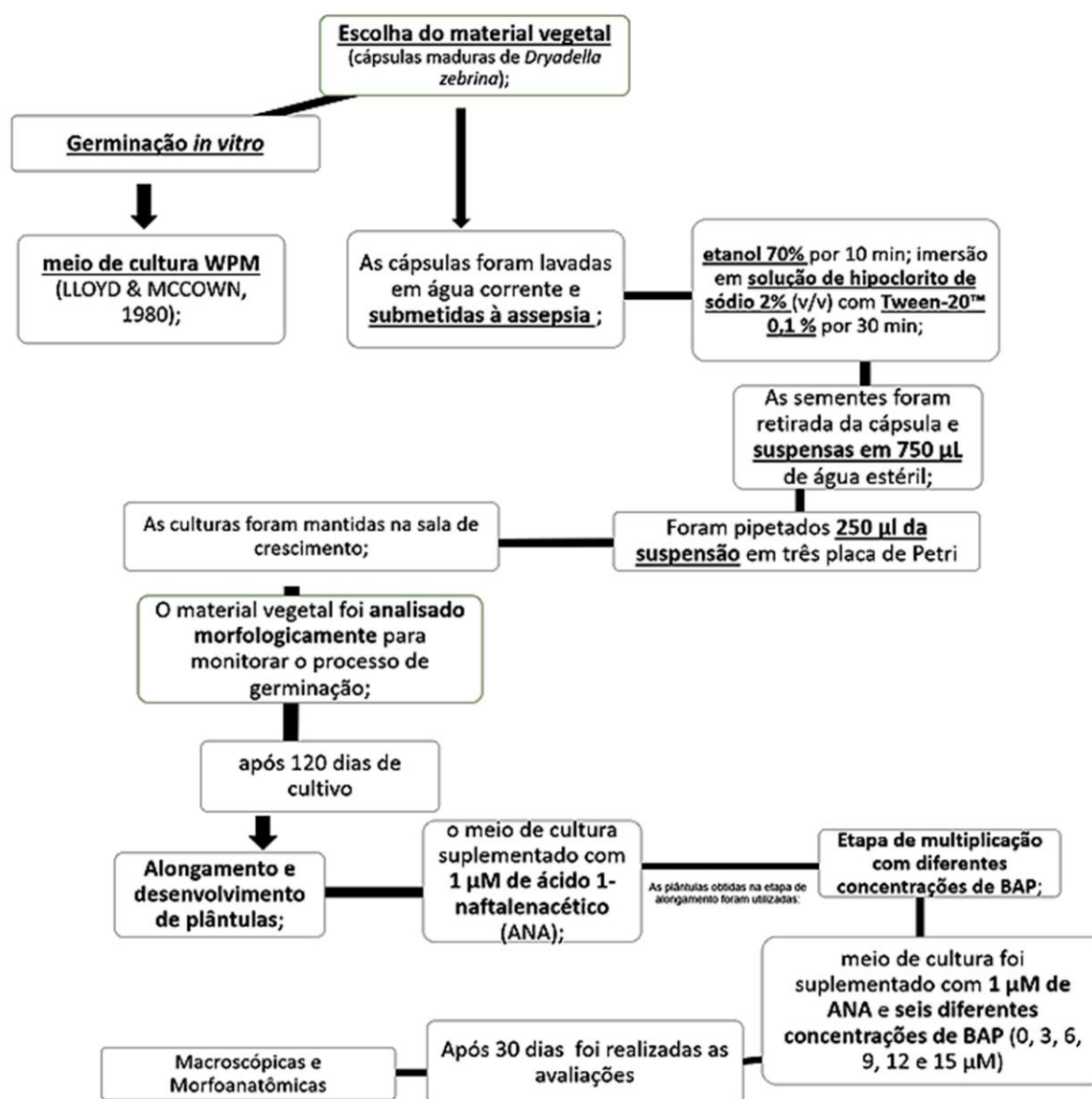


Figura 3. Fluxograma representativo da metodologia do presente trabalho, desde escolha do material vegetal até as análises avaliativas.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*

Na etapa de germinação *in vitro* foi observada uma taxa germinativa de 90%. Este resultado indicou um adequado estágio de maturação e alta viabilidade das sementes para o prosseguimento dos experimentos.

O desenvolvimento *in vitro* foi acompanhado desde o início da germinação, incluindo a formação dos protocormos e a emissão das primeiras folhas e raízes (Figura 4). O presente trabalho observou as cinco fases de desenvolvimento inicial das sementes de orquídeas (STEWART & KANE, 2006): fase 0: semente madura, sem germinação; fase 1: embrião intumescido, produção de rizóide; fase 2: aumento contínuo do embrião, ruptura da testa; fase 3: surgimento do protomeristema; fase 4: emergência da primeira folha; e fase 5: alongamento da primeira folha.

Observou-se que as sementes de *D. zebrina* passam por mudanças de coloração e tamanho que corresponde com os estádios de desenvolvimento. Quando inoculadas (fase 0), as sementes se apresentavam incolores e extremamente diminutas (Figura 4a).

Nos 30 primeiros dias de cultivo, foi possível visualizar o intumescimento das sementes (fase 1), que apresentavam uma coloração esverdeada (Figura 4b.). Barbero et al. (2011), observaram que aos 45 dias de cultivo as sementes também apresentavam estruturas intumescidas, arredondadas ou cônicas, durante a germinação e desenvolvimento inicial de três espécies de Pleurothallidinae.

Koene et al. (2020) relataram taxas de germinação *in vitro* inferiores a 40% para *Dryadella liliputiana*, tendo atingido o estágio de protocormo com ápice sem o desenvolvimento de folhas e radícula. Os autores também relataram que os protocormos formados não progrediram para os seguintes estágios de desenvolvimento, não sendo possível obter um protocolo de micropropagação para a espécie.

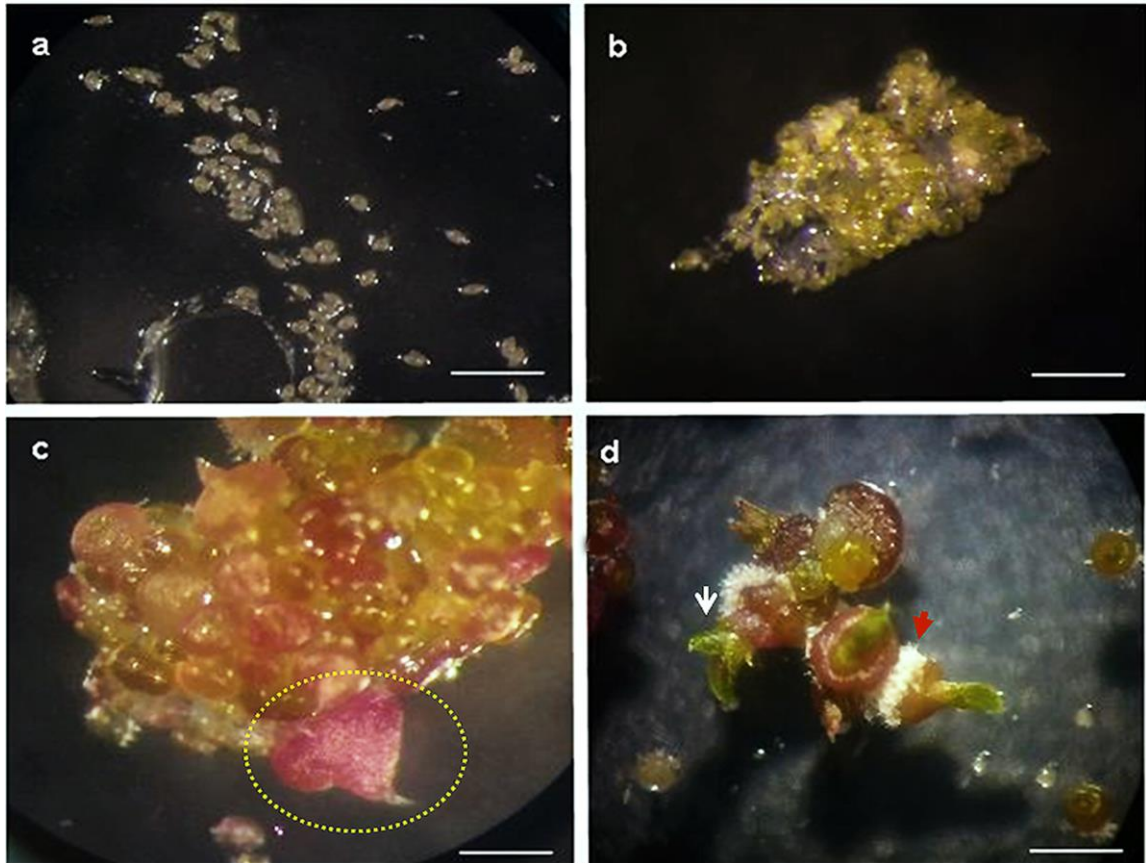


Figura 4. Estágios de desenvolvimento de sementes de *Dryadella zebrina* inoculadas *in vitro*. (a) Semente aclorofilada no dia de inoculação. (b) Semente clorofilada após 30 dias. (c) Protocormo com coloração rosada após 60 dias de inoculação, indicando formação de parte aérea (círculo amarelo). (d) Plântula completa, com parte aérea e presença de rizoides, após 90 dias de inoculação, indicado pela seta vermelha. Barra: 1 mm.

As sementes de orquídeas, em geral, seguem um padrão de germinação bem uniforme, onde as sementes primeiramente intumescem, levando ao rompimento do tegumento e à liberação do embrião (ARDITTI, 1992; KRAUS et al., 2006). Posteriormente se desenvolve uma estrutura denominada protocormo.

Aos 60 dias de inoculação foram observadas estruturas arredondadas e clorofiladas, formando uma estrutura na extremidade (fases 2 e 3), como também a presença de rizoides na porção basal (Figuras 4b e 4c).

Aos 90 dias de cultivo foi possível observar protocormos com um par de folhas e rizoides, podendo ser considerada a fase 4 de desenvolvimento (Figura 4d). Barbero et al. (2011) relatou características semelhantes apenas aos 120 dias de cultivo de sementes de três espécies de Pleurothallidinae.

Após 120 dias de cultivo as plântulas já se apresentavam bem desenvolvidas e aptas para transferência para o meio de cultura de desenvolvimento/crescimento da plântula.

4.3.2 ETAPA DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS

Visando dar continuidade ao processo de desenvolvimento e crescimento *in vitro*, as plântulas obtidas após 120 dias na etapa anterior foram subcultivadas para um meio de cultura suplementado com 1 μM de ANA (figura 5).

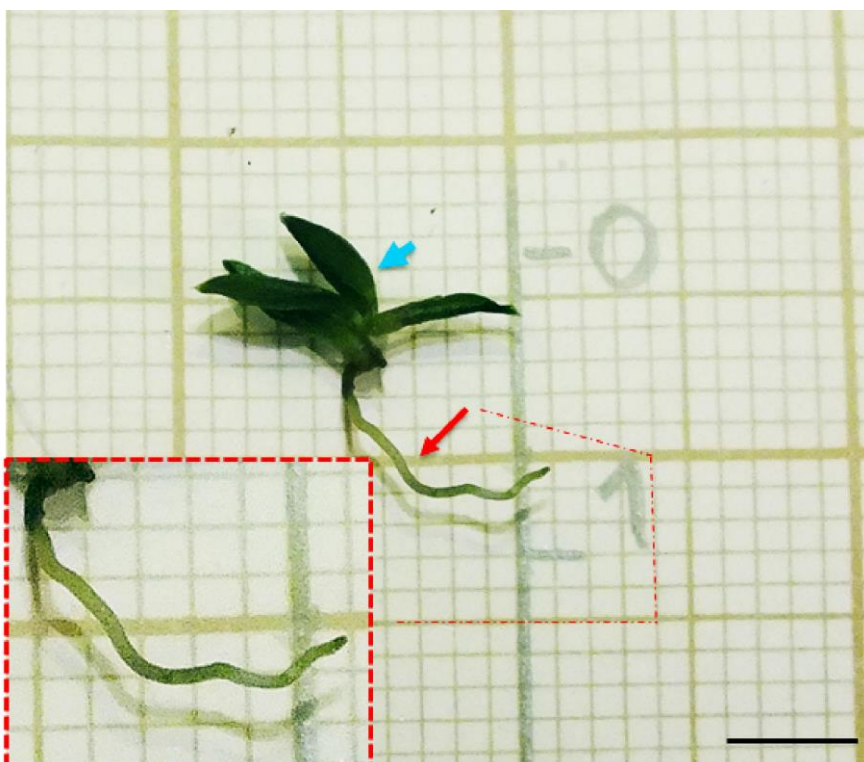


Figura 5. Plântula de *Dryadella zebrina* após 30 dias de cultivo em meio WPM suplementado com 1 μM de ácido 1-naftalenoacético com presença de folhas e raízes. a – Visão geral da plântula, com a seta azul indicando as folhas e a seta vermelha indicando a raiz. Barra: 1 cm.

Após 30 dias as plântulas se apresentavam bem desenvolvidas, com uniformidade em seu comprimento (~ 1 cm), presença de parte aérea e parte radicular (Figura 5). Segundo Laskowski et al., (2008) as auxinas têm efeito positivo no início da formação de raízes a partir da diferenciação celular.

Barbero et al. (2011), estudando o desenvolvimento *in vitro* de *Acianthera teres*, *Octomeria gracilis* e *Octomeria crassifolia*, observaram que duas das espécies apresentaram plântulas bem desenvolvidas aos 180 dias de cultivo, com raízes e folhas. Já a espécie *Octomeria crassifolia* indicou um desenvolvimento mais lento, não apresentando raízes até os 180 dias de cultivo.

As auxinas, em geral, são utilizadas quando a intenção é induzir o alongamento celular, a expansão dos tecidos e divisão celular, a formação de calos e raízes e a embriogênese dos cultivos em suspensão (PIERIK, 1990). Nesta etapa, o ANA pareceu auxiliar no alongamento e no melhor desenvolvimento das plantas. Ensaios anteriores com essa *D. zebrina* utilizando meio de cultura sem a suplementação de ANA indicaram uma menor formação de raízes e um desenvolvimento mais lento (dados não apresentados).

Souto et al. (2010), estudando os efeitos do ANA no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* indicaram o início de reposta para o desenvolvimento da plântula e raiz em 180 dias de cultivo em meio suplementado com 1,34 μM e 5,37 μM de ANA. As plântulas de *D. zebrina* apresentam respostas semelhantes as descritas por Souto et al. (2010) com apenas 150 dias de cultivo.

4.3.3 EFEITOS DO BAP NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

Houve diferença significativa entre as concentrações testadas em vários dos parâmetros avaliados. Após 60 dias de cultivo *in vitro*, as plantas de todos os tratamentos apresentaram sobrevivência superior a 97%. No entanto, foi observado que concentrações superiores a 12 μM de BAP causaram um leve decréscimo na sobrevivência das plantas (Figura 6a).

Também foi observado um aumento significativo na oxidação das plantas a partir da concentração de 9 μM de BAP, indicando o dobro de plantas oxidadas (~18%), quando comparado com os tratamentos contendo menores concentrações (Figura 6b). Sendo assim, foi possível observar que concentrações superiores a 9 μM de BAP são potencialmente deletérias para o desenvolvimento *in vitro* de *D. zebrina*.

Cid (2010) ressalta que as altas concentrações de citocininas podem aumentar a ação da enzima citocinina-oxidase, diminuindo os níveis endógenos de citocininas e, conseqüentemente, inibindo a divisão celular e impedindo a indução de novas brotações. Essas altas concentrações podem ainda reduzir o tamanho das folhas e reduzir as respostas morfogênicas *in vitro*, ocasionando problemas na fase de enraizamento (JORDAN ET AL., 1998).

Giatti e Lima (2007), trabalhando com a regeneração *in vitro* de um híbrido de orquídea, observaram uma maior taxa de oxidação de explantes em meio de cultura

contendo 1 mg L^{-1} de ANA e $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP após 18 dias de cultivo, os quais apresentavam escurecimento na parte basal do explante e discrepância na uniformidade.

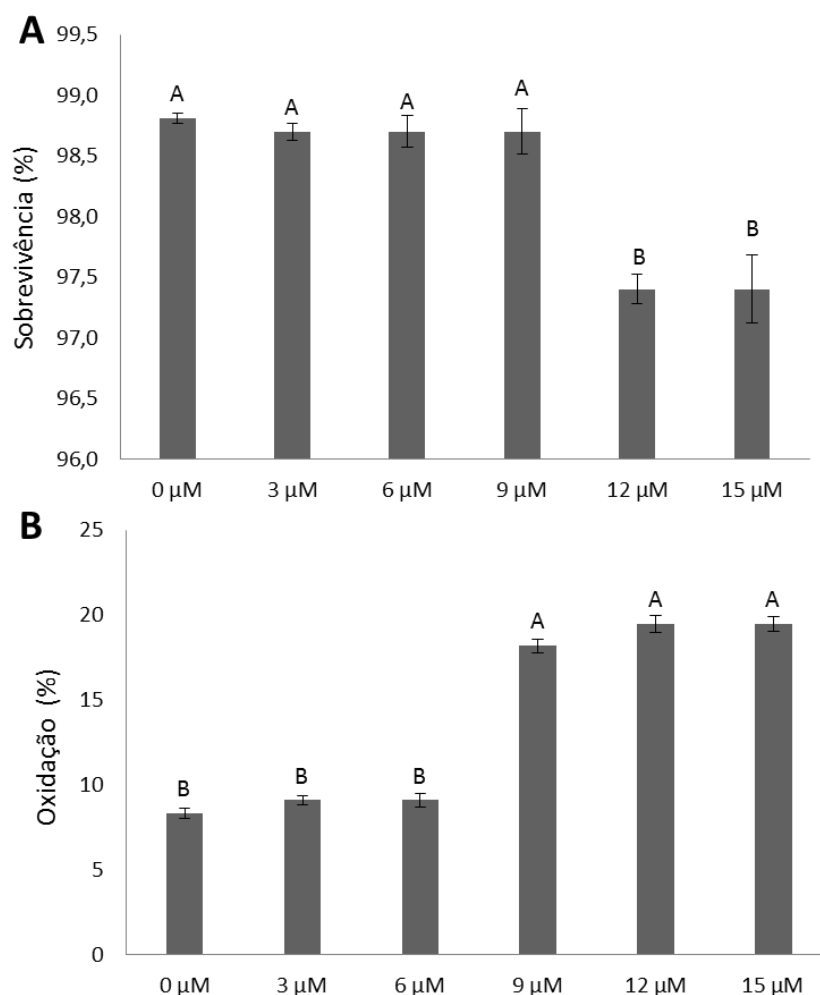


Figura 6. Porcentagens de sobrevivência (A) e oxidação (B) de plantas de *D. zebrina* após 30 dias de cultivo em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. Letras diferentes indicam diferença estatística, as barras de desvio padrão de acordo com o teste de separação de médias SNK (95%).

Com relação ao número médio de brotos foi observada uma maior formação de novos brotos nos tratamentos 3, 6 e 9 µM de BAP (Figura 7). O tratamento suplementado com 6 µM de BAP resultou em 3 brotos em média por plântula cultivada, o dobro do observado no tratamento controle. Os brotos obtidos nessa concentração apresentavam uma notória uniformidade de tamanho e demais características morfológicas (Figura 10).

Em nosso trabalho foi possível identificar uma concentração ideal de BAP para a indução de brotações de *D. zebrina in vitro*. Resultados semelhantes sobre o efeito

positivo do BAP foram descritos para a indução de brotações de *Laelia crispata* e do híbrido *Laelio cattleya* Culminant "Tuilerie" x *Laelio cattleya* Sons Atout Rotunda x *Bassolaeli o cattleya* (SOARES et al., 2010; GIATTI E LIMA, 2007), onde observaram que a adição de citocinina BAP na concentração de 8,88 μ M, foi benéfica para a obtenção de brotações dos híbridos, o que permitiu visualizar as diferenças na capacidade proliferativa das espécies.

O presente trabalho observou que por explante foi possível obter uma média de 3 a 4 brotos na concentração de 6 μ M de BAP, totalizando 20/24 brotos por frasco. Rodrigues et al. (2015) também relataram uma influência positiva no número de brotações formadas com a espécie *Cattleya saintlegerianum* na presença de BAP contendo 8,88 μ M, o qual induziu um total de 15/20 brotos por frasco, podendo assim ser indicado como o melhor tratamento para este parâmetro. De forma semelhante, Pornpienpakdee et al. (2011) propuseram que a suplementação de citocinina com diferentes concentrações em *Dendrobium* sp. pode induzir brotações e também promover o desenvolvimento das plantas.

Os tratamentos suplementados com 12 e 15 μ M de BAP indicaram um significativo decréscimo na formação de brotos, indicando, novamente, um possível efeito deletério do BAP nessas concentrações (Figura 7). As plântulas desses tratamentos apresentavam uma aparente queda de desenvolvimento, com pouca ou nenhuma presença de raízes (Figura 9, 10d, 10e e 10f).

As citocininas são usadas com o intuito de serem empregadas para estimular o desenvolvimento e crescimento de brotações múltiplas (GEORGE, et al., 2008). Segundo Cordeiro et al. (2004), a citocinina induz divisão celular e proliferação de brotos, levando em consideração a sua concentração. Neste sentido, além de levarmos em consideração o tipo de explante, vale reforçar a necessidade de otimizar os níveis exógenos de reguladores de crescimento suplementados no meio de cultura para cada espécie, pois a combinação ideal de ambos permite resultar em diferentes respostas na micropropagação.

No Brasil, as orquídeas tem seu cultivo e comércio por base dos aspectos de extrativismo predatório, combinado com a urbanização e ao aumento das áreas agrícolas, que contribuem para que diversas espécies ficassem em perigo de extinção (GALDIANO JUNIOR et al., 2013).

Como uma estratégia para produção de mudas o presente trabalho através dos usos das técnicas de cultivo *in vitro*, foi possível encontrar uma concentração

ideal do regulador de crescimento BAP, qual permitiu a formação de novos brotos na fase de multiplicação das mudas de *Dryadella zebrina*. Faria et al. (2012), observaram a importância do uso da germinação *in vitro* e da aplicação de diferentes técnicas de cultura de tecidos de plantas tanto sob aspecto da multiplicação rápida quanto preservacionista devido à obtenção de mudas em larga escala e de qualidade fitossanitária.

Araújo et al. (2009) descreveram que as técnicas de cultivo *in vitro* podem suprir as necessidades dos produtores de orquídeas em adquirir mudas com qualidade comprovada, sendo uma alternativa para a obtenção de um grande número de plantas em curto espaço de tempo, tendo como objetivo produzir plantas de espécies nativas para programas de reintrodução em áreas de preservação ambiental, assim evitando a extinção da espécie.

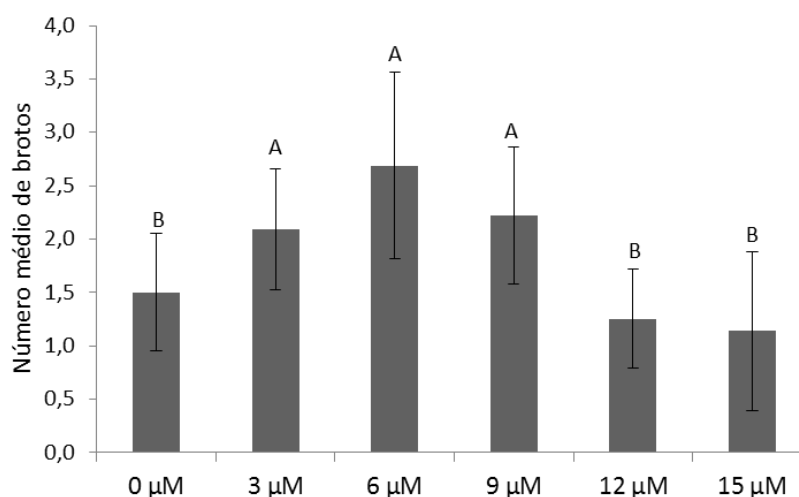


Figura 7. Número médio de brotos formados após 60 dias de cultivo em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. Letras diferentes indicam diferença estatística, as barras de desvio padrão, de acordo com o teste de separação de médias SNK (95%).

Os resultados com relação ao número médio de folhas, diferentemente ao número médio de brotos, não indicaram diferenças entre os tratamentos avaliados (Figura 8a). Já no comprimento médio foliar foi observada uma sutil queda nos tratamentos suplementados com BAP, quando comparado ao controle (Figura 8b).

Essa pequena diminuição do comprimento médio foliar observado pode ser reflexo de um dos principais efeitos fisiológicos do BAP, que é o estímulo da divisão celular. Com a divisão celular acelerada é comum observar células menos alongadas, o que pode interferir no comprimento foliar total. No entanto, durante a

etapa de proliferação de plantas em presença de BAP esse comportamento não comprometeu o desenvolvimento das plantas até o tratamento suplementado com 9 μM .

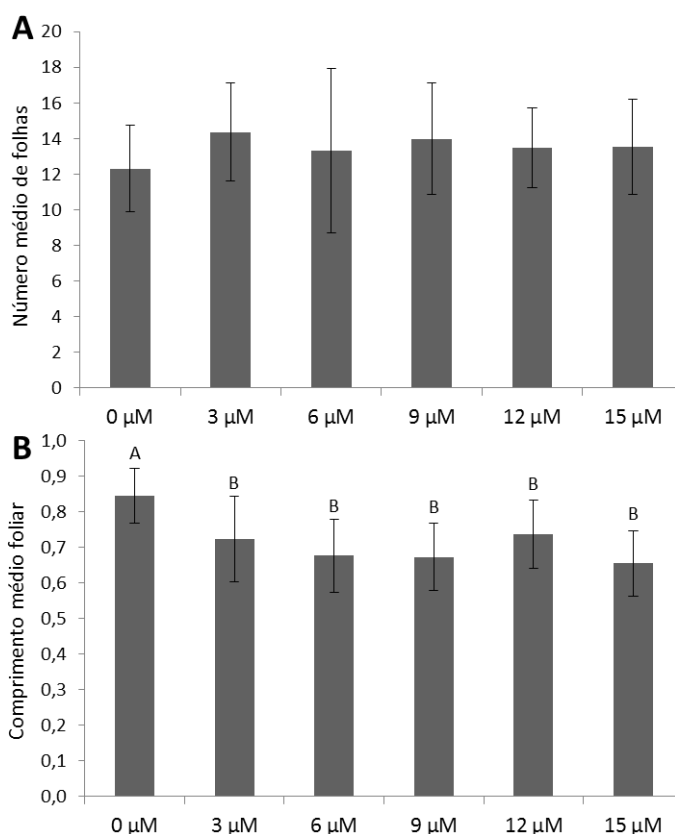


Figura 8. Número médio de folhas (A) e comprimento médio foliar (B) de plantas de *D. zebrina* após 60 dias de cultivo em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. Letras diferentes indicam diferença estatística, as barras indicam o desvio padrão, de acordo com o teste de separação de médias SNK (95%).

Como esperado, para as variáveis número e comprimento de raízes observou-se que o tratamento isento de BAP (apenas suplementado com ANA 1 μM) apresentou as maiores médias (Figura 9a e 9b). Os demais tratamentos suplementados com BAP não indicaram diferença entre si para esses parâmetros (Figura 9).

Navroski et al. (2015) descreveram que altas concentrações de citocinina podem inibir ou retardar a formação de raízes, o que também pode influenciar o seu comprimento, ocasionando a diminuição nos efeitos das auxinas sobre a indução do sistema radicular. Resultados semelhantes foram descritos por Monfort et al. (2012),

que observaram uma diminuição na formação de raízes nos tratamentos com concentrações acima de 8,88 μM de BAP em *Ocimum selloi* Benth.

Os resultados obtidos no nosso trabalho também indicaram essa tendência, sem diferenças entre os tratamentos suplementados com BAP. Neste sentido, é possível observar uma grande sensibilidade da espécie ao BAP, especificamente na formação de raízes *in vitro*. Ou seja, vale ressaltar que a diminuição da produção de raízes com a adição de BAP normalmente ocorre porque esse regulador é inibidor do sistema radicular, sendo assim, importante levarmos em consideração o balanço do regulador de crescimento de maneira endógena e exógena.

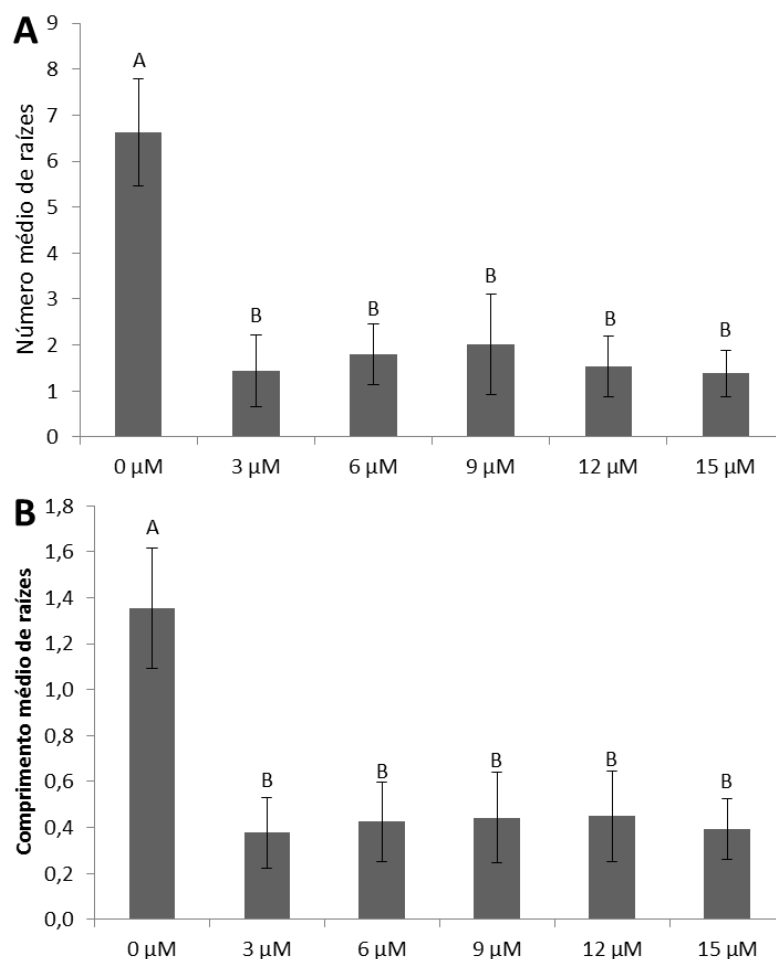


Figura 9. Número médio (A) e comprimento médio (B) de raízes de plantas de *D. zebrina* após 60 dias de cultivo em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. Letras diferentes indicam diferença estatística, de acordo com o teste de separação de médias SNK (95%).

Nossos resultados indicaram uma alta formação de raízes no meio de cultura apenas suplementado com ANA 1 μM . Percebemos que uma maior indução no número de raízes proporcionou um melhor desenvolvimento vegetativo, ou seja, levamos em consideração a absorção maior de água e nutrientes presentes no meio de cultura. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), as auxinas são as mais utilizadas para o desenvolvimento de raízes, crescimento da plântula, variando sua concentração de 0,5 a 5,0 μM de acordo com a espécie ou cultivar.

Santos et al. (2010) realizou um experimento similar com *Epidendrum ibaguense*, onde concluíram que o ANA induziu a formação e o desenvolvimento de raízes *in vitro* na concentração de 134 μM . Resultados semelhantes também foram descritos na promoção do enraizamento e crescimento vegetativo de *Dendrobium nobile* (FARIA et al., 2000).

Por fim, vale ressaltar que apesar da aparente ação inibitória do BAP na formação de raízes em *D. zebrina*, esta citocinina foi capaz de estimular a formação de novos brotos, aumentando a capacidade proliferativa *in vitro*. Uma etapa posterior de enraizamento *in vitro* com as plântulas obtidas na multiplicação com BAP seria suficiente para a obtenção de um maior número de plantas já enraizadas e prontas para serem aclimatizadas.

Neste sentido, nossos resultados indicam que o uso de 1 μM ANA nos brotos formados após a multiplicação em presença de BAP pode favorecer a obtenção de um grande número de plantas eficientemente enraizadas *in vitro*.

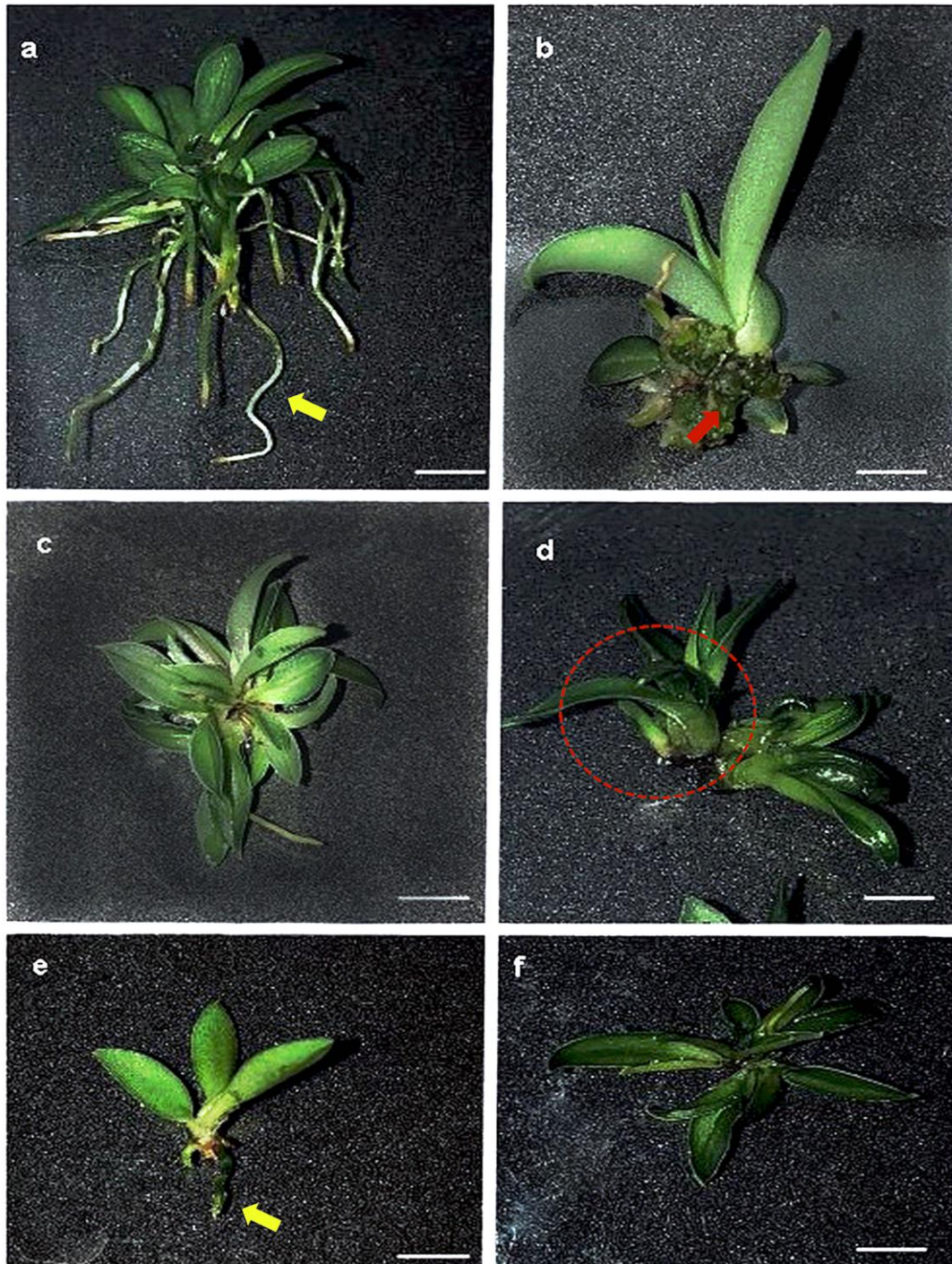


Figura 10. Aspectos morfológicos das plântulas após 60 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado diferentes concentrações de BAP. Plântula do tratamento: controle (A) seta amarela indica raiz; 3 μ M de BAP (B) seta vermelha indica início de formação de brotos; 6 μ M de BAP (C); 9 μ M de BAP (D) círculo vermelho indica broto já formados; 12 μ M de BAP (E) seta amarela indica raiz formada; F - 15 μ M de BAP (F). Barra: 1 cm.

4.3.4 ANÁLISES MORFOANATÔMICAS

Os ápices radiculares de *D. zebrina* analisados no presente trabalho

apresentaram as regiões da epiderme pluriestratificada (velame), córtex e feixe vascular (Figura 11).

A região do velame apresenta duas camadas de células, levemente alongadas, com espaçamento em “U”, sendo com projeções sinuosas, principalmente nos tratamentos 6 e 15 de BAP, o que sugere um aumento na superfície de absorção de água e sais minerais (Figura 11d e 9f). Segundo Silva & Milaneze-Gutierrez (2004) e Ribeiro *et al.* (2020) o velame permite a proteção mecânica da raiz, previne a perda e aumenta a absorção de água e nutrientes, como também contribui para a sobrevivência em determinados ambientes.

O córtex de *D. zebrina* possui células de formato circular, com quatro camadas de células, e o feixe vascular com quatro a sete pólos de protoxilema. Os feixes vasculares são envoltos pelo periciclo, formado por células floemáticas intercaladas com células xilemáticas.

O presente trabalho corrobora com os dados apresentado por Imig *et al.* (2020), que trabalhou com diversas espécies do gênero *Dryadella*. Segundo Imig *et al.*, 2020 a quantidade de feixes vasculares nas raízes de *Dryadella*, está relacionada com a funções de transporte hídrico, onde um maior diâmetro com mais feixes promoverá maior fluxo. Ribeiro *et al.* (2020) também observou uma estruturação semelhante com a morfoanatomia de raízes de *Cattleya caulescens* e *C. endsfeldzii*.

A presença de células vacuoladas se destacou nos ápices radiculares do tratamento com 15 μ M de BAP, quando comparado aos outros dois tratamentos avaliados, especialmente na região meristemática.

Também foi possível visualizar uma maior presença de compostos fenólicos na região do câmbio, devido à coloração mais esverdeada observada no ápice radicular do tratamento com 15 μ M de BAP (Figura 11f). O azul de toluidina é um corante metacromático, que exibe coloração diferente de acordo com o substrato que reage, indicando coloração verde na presença de compostos fenólicos não estruturais (RIBEIRO & LEITÃO, 2020). Este resultado confirma o observado da análise morfológica, onde foram observadas maiores taxas de oxidação das plântulas no tratamento com 15 μ M de BAP (Figura 6).

Bassan *et al.*, (2006) observaram que a ocorrência de compostos fenólicos pode estar ligada a processos de regulação de crescimento, sendo assim, leva-se em consideração a concentração endógena no tecido, das quais possa induzir à

síntese dos compostos polifenólicos.

Segundo Bezerra *et al.*, 2014, a oxidação devida à liberação de compostos fenólicos, é ocasionado pelas enzimas polifenases, as quais são tóxicas e inibem o desenvolvimento do explante, devido a modificação de absorção de metabolitos (ANDRADE *et al.*, 2000).

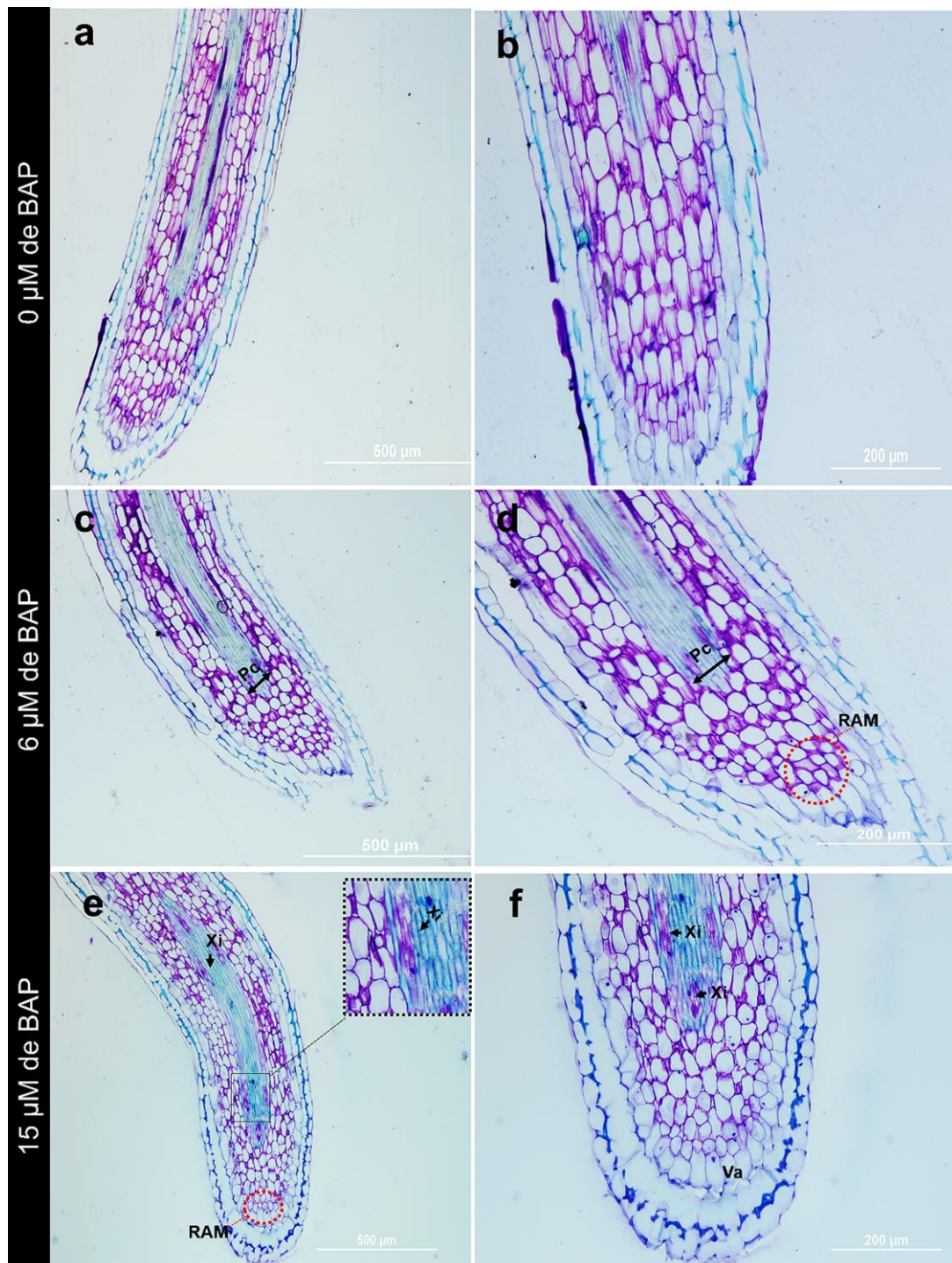


Figura 11. Anatomia de raiz de *Dryadella zebrina* com secções longitudinais em microscopia de luz após 120 dias de cultivo *in vitro*. Tratamento sem a presença de citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) (a-b). Raiz em 6 μ M de BAP (c-d), seta preta indicando o Procâmbio (Pc), círculo vermelho indicando

a região do meristema apical da raiz (d-e), células contendo vacúolo (Va). Raiz em 15 μ M de BAP (e-f), seta indicando o xilema (Xi).

Nas amostras foliares foi possível observar a organização das células de *D. zebrina* quando expostas às diferentes concentrações de BAP, apresentando células nucleadas e vacuoladas, feixes vasculares e células do parênquima lacunoso e lignificado bem definidas.

A seção transversal foliar apresenta formato semicircular. A sua epiderme é uniestratificada, com formato circular nas faces adaxial e abaxial. Observou-se também células epidérmicas adaxiais mais desenvolvidas, das quais podem auxiliar na reserva de água. O presente trabalho corrobora o observado por Pridgeon (1982), em que as espécies do gênero *Dryadella* apresentam células de formatos circulares, elípticos e o mesofilo é heterogêneo.

A presença de parênquima lacunoso foi visível principalmente na amostra sem a presença do fitorregulador (Figura 12a). Já com a presença do fitorregulador (Figura 12b e 12c) foi observada a presença de um parênquima lignificado. Imig *et al.* (2020) descreve a presença de parênquima lignificado para *Dryadella* como uma característica da espécie.

Oliveira (1999), trabalhando com anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae, observou no mesofilo da folha de *Pleurothallis smithiana* células com espessamentos lignificados, dando um aspecto de suculência para o órgão da planta. Macroscopicamente, *Dryadella zebrina* apresenta esse mesmo tipo de aspecto de suculência, onde nas folhas parece armazenar água.

Já o sistema vascular é formado por feixes vasculares colaterais. O número de feixes vasculares é maior na região mediana da lâmina foliar envoltas por células do parênquima. Eles são organizados com padrões diferentes de intercalação de feixes de menor calibre por feixes de maior calibre, principalmente nas amostras com 6 e 15 μ M de BAP (Figura 12b e 12c).

Morfoanatomicamente existem diferenças que suportam os comportamentos distintos de *Dryadella zebrina* em cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de BAP. Sendo assim, o conjunto de informações anatômicas contribui para o melhor entendimento do comportamento da espécie em cultivo *in vitro*.

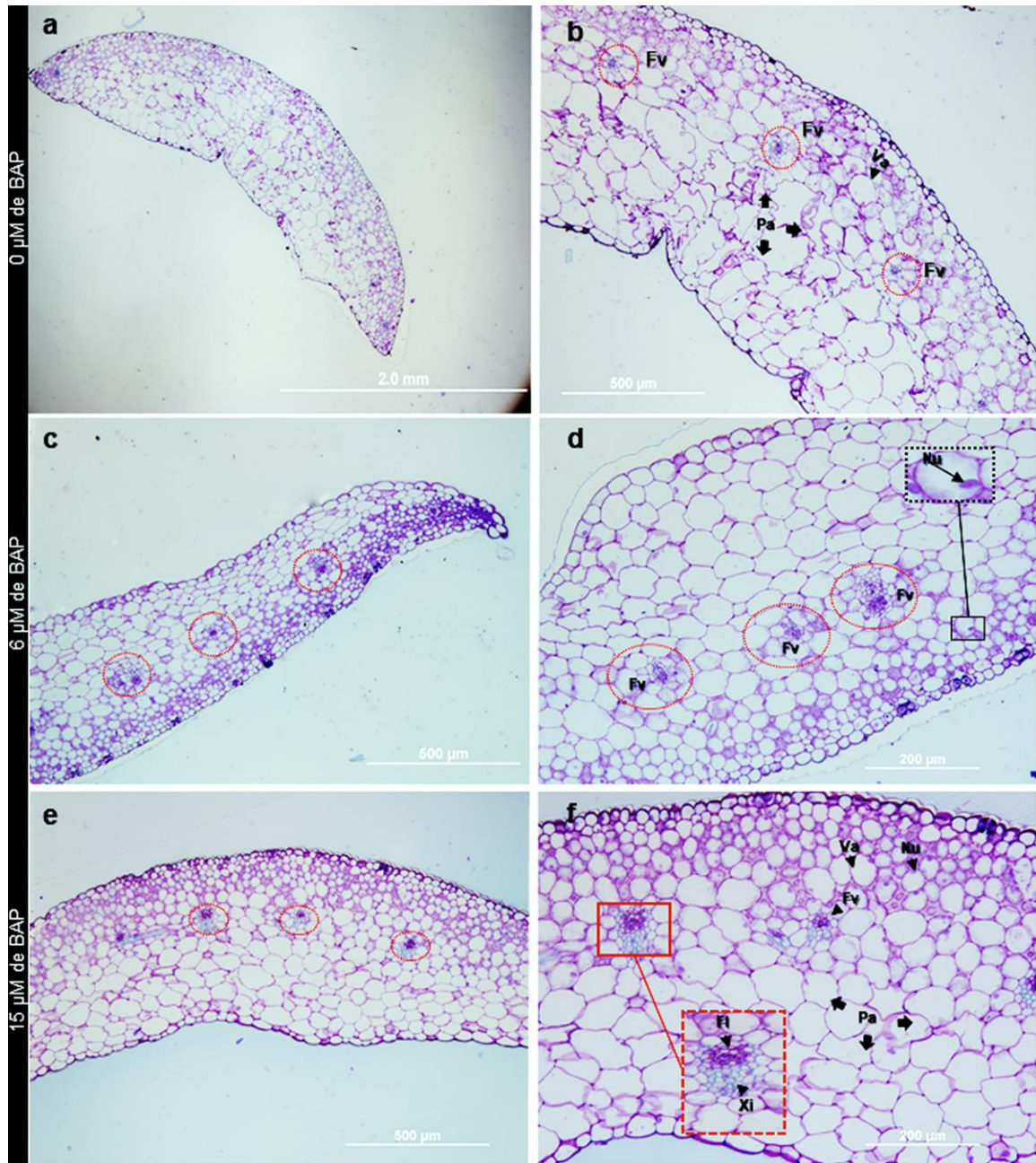


Figura 12. Anatomia foliar de *Dryadella zebrina* com seções longitudinais em microscopia de luz, após 120 dias de cultivo *in vitro*. a – Sem a presença de citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), seta preta indicando os feixes vasculares (Fv), três setas indicando células parênquimas (Pa). b – tratamento de 6 μ M de BAP, com setas indicando os feixes vasculares (Fv), células contendo vacúolo (Va) e Células contendo núcleo em evidência (Nu). c – tratamento de 15 μ M de BAP, com setas pretas e círculos vermelhos indicando os feixes vasculares (Fv), xilema (Xi), floema (Fi), células contendo vacúolo (Va), Células contendo núcleo em evidência (Nu) e três setas indicando células parênquimas (Pa).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A germinação das sementes de *Dryadella zebrina* em meio WPM ocorreu eficientemente, gerando protocormos bem formados. O uso de auxina ácido α -

naftalenoacético mostrou resultados positivos na fase de alongamento e enraizamento *in vitro*, permitindo a formação de plântulas saudáveis. A citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) aumentou a formação de novos brotos de *Dryadella zebrina* nas concentrações de 3, 6 e 9 μM , sendo indicado seu uso para fase de multiplicação *in vitro*.

As análises anatômicas das raízes e folhas permitiram visualizar o comportamento e arranjos de células de acordo com a concentração de BAP em que as plântulas estavam submetidas. Nas raízes, foi observada uma menor organização da região meristemática e a confirmação de acúmulo de compostos fenólicos, especialmente na região do câmbio vascular.

As plântulas obtidas no experimento usando BAP permitiram estabelecer uma concentração ideal para formação de novos brotos e uniformidade das mudas de *Dryadella zebrina*, representando o primeiro relato bem-sucedido de propagação *in vitro* para o gênero *Dryadella*. Neste sentido, os dados aqui obtidos poderão servir como base para novos estudos de propagação *in vitro* de espécies filogeneticamente próximas.

Como perspectivas do presente trabalho, espera-se ampliar o estudo dos efeitos de diferentes citocininas aplicadas a micropropagação de *D. zebrina*, incluindo sua suplementação na indução de estruturas semelhantes a protocormos. Além disso, espera-se avaliar o uso de extratos naturais e bioestimulantes para enriquecimento do meio de cultura e avaliar o comportamento da *Dryadella zebrina* em contato com o meio suplementado. O uso de sistemas de imersão temporária (biorreatores) também pode colaborar para um melhor desenvolvimento *in vitro* das plantas, maximizando sua multiplicação e crescimento.

6 REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, H., & PANT, B. Effect of 6-benzylaminopurine and-naphthalene acetic acid hormonal supplements on the in vitro seed germination and seedling development of orchid *Otochilus albus* Lindl. **African Journal of Biotechnology**, 18(22), 472-477. 2019.
- ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.174-180, 2000.
- ARDITTI, J. Fundamentals of orchid biology. New York, **John Wiley & Sons**. 530p, 1992.
- ARDITTI, J. & GHANI, A. K. A. Tansley Review no. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, 145, 367-421. DOI: 10.1046/j.1469-8137, 2000.
- ARAÚJO, A. G. de; PASQUAL, M. RODRIGUES, F. A.; CARVALHO, J. G. de; ZARRAGA, D. Z. A. Fontes de nitrogênio no crescimento in vitro de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.
- AREMU, A. O., PLAČKOVÁ, L., PĚNČÍK, A., NOVÁK, O., DOLEŽAL, K., & VAN STADEN, J. Auxin-cytokinin interaction and variations in their metabolic products in the regulation of organogenesis in two *Eucomis* species. **New biotechnology**, 33(6), 883-890. 2016.
- BARBERO, A. P. P., BARROS, F. D., SILVA, E. A. D., & SUZUKI, R. M. Influence of water stress on seed germination and early development in three species of *Pleurothallidinae* (Orchidaceae). **Brazilian Journal of Botany**, 34(4), 593-601, 2011.
- BARROSO, J. et al. In vitro seed germination, differentiation and production of miniturbers from *Ophrys lutea* Ca., *Ophrys fusca* Link and *Ophrys speculum* Link. **Scientia Horticulturae**, v. 42, p. 329-37. 1990.
- BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafistula (*Peltophorum dubium*). **Ciência Florestal**, v.16, n.4, p.381-390, 2006.
- BEZERRA, F. M. R.; ALOUFA, I. A. M.; FREIRE, M. A. F.; SANTOS, D. D. Effect of 6-benzylaminopurine on in vitro propagation of *Mimosa caesapiniifolia* Benth (Fabaceae). **Rev. Árvore** vol. 38 no.5, Viçosa, Sept.Oct. 2014.

- BHATTACHARYYA, P., KUMARIA, S., & TANDON, P. High frequency regeneration protocol for *Dendrobium nobile*: a model tissue culture approach for propagation of medicinally important orchid species. **South African Journal of Botany**, 104, 232-243. 2016.
- BHERING, L.L. Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.17: 187-190p, 2017.
- CASTILLO-PÉREZ, L. J., MALDONADO-MIRANDA, J. J., ALONSO-CASTRO, Á. J., & CARRANZA-ÁLVAREZ, C. Effect of 6-benzylaminopurine and potassium nitrate on the in vitro micropropagation of *Laelia anceps* subsp. *anceps* (Orchidaceae). **Biotecnia**, 22(1), 32-38. 2020.
- CHASE, M.; FREUDENSTEIN, J.; PRIDGEON, A.; *et al.* An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, p. 151–174, 2015.
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de Plantas. Brasília: Embrapa**, p. 15-49, 2010.
- CORDEIRO, I. M. C. C. et al. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). **Cerne**, v.10, n.1, p.118-124, 2004.
- CITES, Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. Apêndices II. Disponível em: <https://cites.org/sites/default/files/eng/app/2017/E-Appendices2017-10-04.pdf>. Acesso em: 23/02/2019.
- DRESSLER, R. L. The Orchids: natural History and Classification. **Harvard University Press**, Cambridge, Massachusetts. 322 p., 1981.
- DRESSLER, R.L. How many orchid species? **Selbyana** 26: 155-158, 2005.
- FARIA RT; RODRIGUES FN; OLIVEIRA VRO; MÜLLER C. In vitro *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira** 22: 780-783. 2004.
- FARIA, R. T. de; ASSIS, A. M. de; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. de. Produção de orquídeas em laboratório. Londrina: Macenas, p. 116, 2012.
- GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; FARIA, R. T.; LEMOS, E. G. M. Concentrações de sacarose no desenvolvimento in vitro e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. Semina: **Ciências Agrárias**, 34(2): 583-592, 2013.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. 1. ed. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq**, p.183-260. 1998.

- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. de. Plant propagation by tissue culture, **3rd ed. Dordrecht: The Background**, V. 1, 501 p. 2008.
- GIATTI, L., & LIMA, G. P. P. Ação do BAP na regeneração in vitro de *Blc Owen Holmes Ponkan* x *Brassavola digbiana* nº 2. **Ciência e Agrotecnologia**, 31(5), 1279-1285, 2007.
- HOEHNE, F. C. Orchidaceae. In: F. C. Hoehne (ed.). **Flora Brasílica**. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, São Paulo, v. 12, parte 1, pp. 1-254, 1940.
- HOSSAIN, M.M.; SHARMA, M.; PATHAK, P. Cost effective protocol for in vitro mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. – a medicinally important orchid. **Engineering in Life Sciences**, v.9, p. 444-453, 2009.
- IMIG, D. C.; JUNIOR, J. A. J.; MAUAD, R. S. V. A.; AMANO, E.; SMIDT, E. C. Vegetative anatomy and its systematic significance in the *Dryadella* Luer (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Journal of Botanical Taxonomy and Gerbotany*, **Feddes Repertorium**, 131, 175–187. 2020.
- JOHANSEN, B.; H. RASMUSSEN. *Ex situ* conservation of orchids. **Opera Bot.**, v. 113, p. 43–48, 1992.
- JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Brazilian consumption of flowers and ornamental plants: habits, practices and trends. *Ornamental Horticulture*, v.23, n.2, p.178 - 184, 2017.
- KARREMANS, A. P. Genera Pleurothallidinae: an update phylogenetic overview of Pleurothallidinae. **Lankesteriana**, v. 16, p. 219-241, 2016.
- KARREMANS, A. P., & DAVIN, N. Genera Pleurothallidarum: The Era of Carlyle Luer. **Lankesteriana**, 17(2), 1-8. 2017.
- KOENE, F.M., AMANO, E., SMIDT, E.D.C., RIBAS, L.L.F. Asymbiotic germination and morphological studies of seeds of Atlantic Rainforest micro-orchids (Pleurothallidinae). **PloS one**, v. 15, e0243297, 2020.
- KUO J, O'BRIEN TP. Lignified sieve elements in the wheat leaf. **Planta** 117:349–353, 1974.
- KRAUS JE, KERBAUY GB & MONTEIRO WR. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. F. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea**, 33:177-184, 2006.

- LASKOWSKI, M., GRIENEISEN, V. A., HOFHUIS, H., TEN HOVE, C. A., HOGEWEG, P., MARÉE, A. F. M. & SCHERES, B. Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. **PLOS Biology**, v6, n.12, p. 2721-2735, 2008.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-426, 1980.
- LI, Y. Y., CHAN, C., STAHL, C., & YEUNG, E. C. Recent advances in orchid seed germination and micropropagation. In *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses Methods and Protocols* (pp. 497-520). **Humana Press**, New York, NY. 2018.
- LO, S.; NALAWADE, S. M.; KUO, C.; CHEN, C.; TSAY, H. Asymbiotic germination of imature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino – A medicinally important orchid. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**, v. 40, p. 528–535, 2004.
- LUER, CA. Icones Pleurothallidarum XVIII. Systematics of *Pleurothallis* Subgen. *Pleurothallis* Sect. *Pleurothallis* Subsect. *Antenniferae*. subsect. *Longiracemosae*. Subsect. *Macrophyllae-Racemosae*. Subsect. *Perplexae*. Subgen. *Pseudostelis*. Subgen. *Acuminatia*. Monographs in Systematic Botany from the **Missouri Botanical Garden** 76: 1-182, 1999.
- LUER, CA. Icones Pleurothallidarum VIII. Reconsideration of *Masdevallia*, and the systematic of *Specklinia* and vegetatively similar genera (Orchidaceae). Monographs in Systematic Botany from the **Missouri Botanical Garden** 105: 1-300, 2006.
- MILLER, D. & WARREN, R. Orquídeas do Alto da Serra: da Mata Atlântica Pluvial do Sudeste do Brasil. Rio de Janeiro, Lis Gráfica Ltda. 1996.
- MIYOSHI, K., MII, M. Phytohormone pré- treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae**, v. 63, n. 3-4, p. 263-267, 1995.
- MONFORT, L.E.F. et al. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. **Rev. bras. plantas med.** [online], vol.14, n.3, pp.458-463. ISSN 1516-0572, 2012.
- NAVROSKI, MARCIO C.; REINIGER, LIA R. S.; PEREIRA, MARIANE O. Alongamento in vitro de rebentos de *Eucalyptus dunnii* em função de diferentes

genótipos e concentrações de ácido 1-naftil-acético (ANA). **Rev. de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 38, n. 1, p. 79-86, mar. 2015.

OLIVEIRA, C. D. V.; SAJO, G. M. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. *Revta brasil. Bot.*, São Paulo, V.22, n.3, p.365-374, dez. 1999.

PIERIK, R. L. M. Cultivo in vitro de las plantas superiores. 3. ed. Madrid: **Mundi-Prensa**, 326 p, 1990.

PORNPIENPAKDEE, P.; SINGHASURASAK, R.; CHAIYASAP, P.; PICHYANGKURA, R.; BUNJONGRAT, R.; CHADCHAWAN, S.; LIMPANAVECH, P.; MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v.124, p. 490-499, 2011.

PINHEIRO, F., BARROS, F. & LOURENÇO, R.A. O que é uma Orquídea? In: F. BARROS & G.B. KERBAUY (org.). *Orquidologia Sul-Americana: uma compilação científica*. **Secretaria do Meio Ambiente/Instituto de Botânica, São Paulo**, pp. 11-33. 2004.

PRIDGEON, A. M. Diagnostic Anatomical Characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 69, n. 6, p. 921–38. 1982.

PRIDGEON, A. M.; CHASE, M. W. Phylogenetics of The subtribe Pleurothallidinae (Epidendreae: Orchidaceae) based on Combined Evidence from DNA Sequences. **Lankesteriana**, v. 7, p. 49-50, 2003.

RIBEIRO, O. P. J.; PAULA-SOUZA, J.; SILVA, J. C. Morphoanatomy of vegetative organs of two species of *Cattleya* (Orchidaceae) Native to Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 71, e01672017, 2020.

RIBEIRO, V. C., & LEITÃO, C. A. E. Utilisation of Toluidine blue O pH 4.0 and histochemical inferences in plant sections obtained by free-hand. **Protoplasma**, 257(3), 993-1008. 2020.

RODRIGUES, Lennis Afraire et al. Propagação in vitro de *Cyrtopodium saintlegerianum* rchb. f. (orchidaceae), uma orquídea nativa da savana brasileira. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.**, Viçosa, v. 15, n. 1, pág. 10-17, março de 2015.

SANTOS, M.R.A. et al. BAP e AIB no cultivo in vitro de *Epidendrum ibaguense* KUNTH. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.6, n.2, p.90-98, 2010.

- SOARES, J.D.R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; ARAÚJO, A.G. Estiolamento e luz artificial no cultivo in vitro de orquídeas nativa e híbrida. **Ciência Rural**, v.40, p.1941-1947, 2010.
- SOUTO JS; MORIMOTO, JM; FERREIRA WM; NAKABASHI M; SUZUKI RM. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento in vitro de *Cattleya bicolor* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências** 8: 179-185, 2010.
- STEWART, S.L. & KANE, M.E. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae) a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 86:147-158, 2006.
- SU, Y. H., LIU, Y. B. & ZHANG, X. S. Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant**, v. 4, p. 616–625, 2011.
- SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, v. 104, p. 543-556, 2009.
- THE PLANT LIST. Publicado na Internet; <http://www.theplantlist.org>, 2019.
- VUDALA, S. M., PADIAL, A. A., & RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Hadrolaelia grandis* through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **South African Journal of Botany**, 121, 76-82, 2019.